

明 細 書

一本鎖核酸の伸長方法と一本鎖核酸伸長装置及びDNAチップ

5

技術分野

本発明は、水溶液中にランダムコイル状等の形態で存在する一本鎖核酸を、高周波電界の作用で伸長させる技術に関する。

10 背景技術

マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、「DNAチップ」と総称。）と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板に関する技術がある。

このDNAチップ技術は、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数のDNAオリゴ鎖やcDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。このためDNAチップは、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等にご利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用され始めている。

前記したDNAチップ技術では、現在、網羅的解析のために集積遺伝子数の増加に注力する技術開発から、その精度及び反応効率の向上を目指す技術開発へ移行を始めている。

より具体的には、DNAチップの臨床診断などへの応用を視野に入れ、基板上に集積された遺伝子の数量よりも、感度、定量性、精度の高さ、反応時間の短縮等が要求され始めている。

ここで、特開平 6－3 8 7 6 8 号公報（請求項 1 他参照）では、DNA、RNA、それらの誘導体、またはそれらの断片を、酵素反応または化学反応によって処理する方法または装置を前提として、高粘度溶液中や電場の存在で熱揺らぎを排除する技術が開示されている。この技術によって、DNA 鎖の合成反応等の遺伝子高分子の処理を、塩基配列の特性に影響されずに、効率よく、かつ正確に実施できると説明されている。即ち、この技術は、電場存在状態で遺伝高分子に酵素的・化学的反応を行わせることを目的としている。

次に、特開平 8－3 2 2 5 6 8 号公報（請求項 1、段落 0 0 0 1 他参照）では、一本鎖になった鋳型 DNA にプライマーを結合させるアニーリング反応工程及びプライマーから DNA 鎖を伸長させる合成反応工程において、合成のための材料や合成酵素等を含む反応溶液に電界を印加して前記鋳型 DNA を直鎖状にすることを特徴とする DNA 複製方法が開示されている。この技術は、DNA の塩基配列決定のためのシーケンス法や DNA 試料を増幅する PCR 法に用いることを目的としているため、電界を印加する反応溶液には、前記目的に必要な成分が含まれていることを前提としている。

しかしながら、DNA 合成のための核酸材料や酵素、プライマーなどの成分を全く含まない純水等の水溶液中に存在する一本鎖核酸に対する高周波交流電界その他の電界の作用又は効果については不明であった。また、DNA チップ等のバイオアッセイ用の集積基板上の狭小な容積の反応場に貯留されている水溶液中でのハイブリダイゼーションの効率と高周波交流電界との関連についても検証されていなかった。

そこで、本発明は、DNA 合成のための核酸材料や酵素、プライマーなどの成分を全く含まない水溶液中に存在する一本鎖核酸に対する高周波交流電界の作用を検証するとともに、前記作用を前記一本鎖核酸が他

方の相補鎖となるハイブリダイゼーションの効率向上のために利用することを主な目的とする。

発明の開示

5 本発明では、まず、(1) 純水又は pH 5 ~ 11 の水溶液中に遊離して存在する一本鎖核酸、(2) 前記水溶液に臨設された対向電極の一方の電極表面に固定されて存在する一本鎖核酸、のいずれかに対して、高周波交流電界を作用させることによって、前記一本鎖核酸を伸長させる核酸伸長方法並びに前記伸長手段を用いる核酸伸長装置を提供する。

10 また、純水又は pH 5 ~ 11 の水溶液が貯留された反応場に印加された高周波交流電界によって、前記水溶液中に遊離又は固定化されて存在する一本鎖核酸を前記高周波交流電界の作用で、または誘電泳動の作用で伸長させる手段を用いる DNA チップを提供する。

15 なお、本発明において「水溶液」とは、DNA 合成を目的とする核酸材料や酵素、プライマーなどの他の高分子成分を全く含まない純水又は pH 6 ~ 11 の水溶液を意味し、該水溶液は、相補鎖を有する核酸間でのハイブリダイゼーションの場を提供できる液相として機能する。

図面の簡単な説明

20 図 1 は、ランダムコイル状に丸まった高次構造をとっている DNA 等の一本鎖核酸 (1) が水溶液 (R) 中に遊離した状態で存在している様子を模式的に示す図である。

図 2 は、高周波交流電界の作用によって一本鎖核酸 (1) を電界に沿って一方向に向かせた状態を模式的に示す図である。

25 図 3 は、電極 (E) の表面 (f) に末端部位が固定化されている一本鎖核酸 (3) が印加電圧 0 の状態でランダムコイル状の高次構造をとっ

ている状態を示す図である。

図4は、電極(E)に固定化された一本鎖核酸(4)が高周波交流電界の作用で伸長されている様子を模式的に示す図である。

図5は、電極(E)に対向する他方の電極(e)をより狭小な面積に
5 形成した構成を示す図である。

図6は、DNAチップ等の基板上に配列可能な構成を備える反応検出部の一実施形態を示している

図7は、同反応検出部(6)が配列されたDNAチップ(10)の一実施形態を示す外観斜視図である。

10 図8は、実験の観察で得られた顕微鏡写真(図面代用写真)であって、電界印加前の水溶液中のランダムコイル状態のDNA一本鎖の写真である。

図9は、実験の観察で得られた顕微鏡写真(図面代用写真)であって、電界印加によって伸長されたDNA一本鎖の写真である。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明に係る一本鎖核酸の伸長技術を好適に実施できる実施形態を、添付図面に基づいて説明する。

図1は、ランダムコイル状に丸まった高次構造をとっているDNA等の
20 の一本鎖核酸1が、符号Rで示す水溶液中に遊離した状態で存在している様子を模式的に示している。この図1の状態では、印加電圧は0である。なお、図1その他の図面中の符号Aは、水溶液Rを貯留可能な反応場を示しており、符号E、Eは、前記反応場Aに貯留された水溶液Rを挟むように対向配置された、アルミニウムなどから形成された電極を示
25 している。また、符号Vは、電極E、Eに接続された交流電源、符号S1はオフ状態のスイッチ、符号S2はオン状態のスイッチをそれぞれ示

している。

電極 E-E間の距離は、 $40\text{ }\mu\text{m}$ 以下に設計するのが望ましい。その理由は、電極 E-E間の距離が $40\text{ }\mu\text{m}$ よりも大きいと、電圧印加による熱エネルギーによって水溶液 R に対流が起き易くなると考えられるからである。この対流は、高周波交流電界による一本鎖核酸 1 の伸長化作用の障害になると考えられるので、水溶液 R には極力発生させないようにするのが望ましい。

次に、図 2 に示すように、電源 V によって電圧印加された電極 E, E によって水溶液 R に高周波交流電界（図中点線で示す。）が形成される。この高周波交流電界の作用によって、電気分解が発生しない状態で、前記一本鎖核酸 1 を電界に沿って一方向に向かせることができる。その結果として一本鎖核酸が伸長された状態を示している。なお、符号 2 は、伸長状態とされた一本鎖核酸を示している。

図 3 は、電極 E の表面 f に、その末端部位が固定化されている一本鎖核酸 3 が、印加電圧 0 の状態でランダムコイル状の高次構造をとっている状態を示している。なお、電極表面 f は、一本鎖核酸 3 の末端がカップリング反応等の化学結合によって固定されるように予め表面処理されている。一例を挙げれば、ストレプトアビジンによって表面処理された表面 f には、ビオチン化された一本鎖核酸の末端を固定できる。

図 4 は、固定化された前記一本鎖核酸 4 が、高周波交流電界の作用で伸長されている様子を示している。固定化されている一本鎖核酸 4 は、固定化されたままで一方向を向き、その結果として電界に沿って伸長される。なお、一旦伸長しても、高周波交流電界の印加電圧を 0 に戻した場合には、一本鎖核酸は元のランダムコイル状に戻る。

図 5 に示された構成では、電極 E に対向する他方の電極 e をより狭小な面積に形成しておくことによって、該電極 e に集中する不均一電界（図

5 中に一点鎖線で示す。)を形成している。なお、不均一電界を形成するためには、スパッタリングによる表面処理及びエッチング技術等によって、電極表面を凹凸のある粗面状に処理する構成なども採用できる。電極の凸部や尖ったエッジ部分には電気力線が集中するからである。

5 このように、電気力線が一部に集中する不均一電界が電極eの近傍に形成されるように工夫すると、該水溶液R中に遊離して存在する一本鎖核酸1(図1参照)を、電気力線が集中する部位(電極e)に向かって誘電泳動により伸長させながら移動させることができる。その結果として、電極eにその末端部位を固定化することができる。なお、図5中の
10 符号5は、電極eに末端部位が固定化された一本鎖核酸を示している。

ここで、図6は、DNAチップ等の基板上に配列可能な構成を備える反応検出部の一実施形態を示している。この反応検出部6には、水溶液Rを貯留できる微少凹部領域である反応場Aと、該反応場Aに臨設されて対向する電極E、Eと、が設けられており、この図6中の符号7は、
15 上記した固定化方法によって、電極Eの表面fに対し、予め伸長状態で固定化されている一本鎖のDNAプローブ群を示している。

図6中の符号8は、微小ノズルNから反応場Aに滴下されてきた標的一本鎖核酸を示している。この標的一本鎖核酸8は、滴下直後においてはランダムコイル状の高次構造をとっている。この丸まった標的一本鎖
20 核酸8に対して、電極E-E間に高周波交流電界を印加すると、符号9に示すような伸長状態の一本鎖核酸に構造変化させることができるとともに、これを電界(電気力線)に沿ってDNAプローブ7側に移動させることができる。

DNAプローブ7の近傍領域に標的一本鎖核酸8を十分に引き寄せた
25 後に、電界オフの時間を設けることによって、自然なブラウン運動の下、pHやT_m等の好適な条件に基づいて、ハイブリダイゼーションを効率

よく、短時間に進行させることができる。即ち、ともに伸長状態にある DNA プロブ 7 と標的一本鎖核酸 8 との間では、双方に相補的な塩基配列がある場合には、立体障害の影響や水溶液 R の対流の影響を受けることもなく、ミスハイブリの少ない精度の高いハイブリダイゼーションが進行させることができる。

図 7 に示されたような反応検出部 6 を基板上に多数配列された DNA チップを提供することができる。一例を挙げれば、図 7 に示されたような円盤状基板 10 の上に、多数の前記反応検出部 6 を放射状又は周方向に配列しておき、所望の DNA プロブ 7 を、グルーピングされた反応検出部 6 に対して固定させておくことができる。

(実施例)

本発明に関わる高周波交流電界による一本鎖核酸の伸長作用を検証するための実験を行った。

λファージ DNA (宝酒造) の一部配列 (5 k b p) を PCR 法 (中山「バイオ実験イラストレイテッド」第 3 巻、第 2 章、秀潤社 (1998) 参照) により増幅した。この際、PCR 産物を蛍光ラベルするために d T T P : d U T P - F I T C を 1 : 1 の比率で加えた。また、PCR 増幅時、片側プライマーは 5' 末端をビオチン修飾したもの (東洋紡績株式会社) を用いた。

前記 PCR 産物をゲル電気泳動し、5 k b p の位置のバンドを切り出し、ゲルから生成した二本鎖 DNA の断片を抽出した。この DNA 断片の抽出には QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を使用した。

一本鎖 DNA の調整の概要。この一連の工程では DYNABEADS kilobase binder kit (DYNAL 社) を使用し、得られた二本鎖 DNA をビーズ上に修飾されたアビジンに結合させ、次にアルカリ変性させて、二本鎖 DNA のうちビチオンで修飾されていない側の一本鎖 DNA を液相中に遊離さ

せることによって次段階の実験に用いる一本鎖DNAを得た。

具体的にはキット中のビーズ(DYNABEADS M-280 streptavidin) 5 μ l
をBinding Solution 20 μ l で洗浄後、20 μ l Binding Solution中に
懸濁した。次にアビジンビオチン反応を実施した。ビオチン化プライマ
5 ーでPCR増幅したサンプルDNA 20 μ l と前記ビーズ液を混合し、
室温で3時間インキュベートした。そして、前記ビーズを磁石で集めて、
上清を取り除き、40 μ l Washing bufferで二回洗浄することにより未
反応DNAの除去を行った。

200 mMの水酸化ナトリウム 20 μ l を加え、0℃で10分間イン
10 キュベートし、DNAのアルカリ変性を行った。遊離した一本鎖DNA
を含む上清を回収した。この上清をマイクロコン(MILLIPORE社)を用いて
濃縮し、液相を超純水に置換する操作を行うことにより水酸化ナトリウ
ムの濃度を下げた。

得られたDNA水溶液 5 μ l を対向電極の幅を25 μ mにした一对の
15 アルミニウム電極間に置き、1 MHz、1.5 V/ μ mの高周波交流電
界電圧を印加したところ、前記水溶液中のDNA一本鎖を伸長させるこ
とができた。この様子をエバネッセント顕微鏡(オリンパス光学工業株式
会社製)による観察で確認した。この観察で得られた顕微鏡写真を図8、
図9に示す。

20 図8は、電界印加前の水溶液中のランダムコイル状態のDNA一本鎖
の写真、図9は電界印加によって伸長されたDNA一本鎖の写真を示し
ている。

産業上の利用可能性

25 本発明は、例えば、DNAチップを構成する基板上の所定箇所に検出
用のDNAプローブ等の検出用核酸を伸長させた状態で固定する技術、

固定化された検出用の核酸と相補鎖を備える標的核酸を伸長させながらハイブリダイゼーションを行う技術などに利用できる。

純水又はpH 5～11の水溶液中に、遊離又は末端固定化されて存在する一本鎖核酸に対して高周波交流電界を印加すると、熱運動のためランダムコイル状の形態となっている前記一本鎖核酸を、電気分解を防止しながら伸長させることができる。即ち、一本鎖核酸の骨格をなすリン酸イオン（陰電荷）とその周辺にある水がイオン化した水素原子（陽電荷）とによってイオン雲を作っていると考えられるので、これらの陰電荷及び陽電荷により生じる分極ベクトル（双極子）が、高周波交流電界の印加により全体として一方向を向き、その結果として一本鎖核酸が伸長させることができる。

加えて、電気力線が一部に集中する不均一電界が前記水溶液に形成されるようにすると、該水溶液中に遊離して存在する一本鎖核酸を電気力線が集中する部位に向かって移動させることができる。これは誘電泳動と呼ばれている。例えば、印加電圧の上昇に伴い生じる対流の影響を減らすために、25 μm 以下の間隔に配置された対向電極間に前記水溶液をおき、この水溶液に前記高周波の周波数が500 kHz以上であり、かつ印加電圧は電界強度1.2 V/ μm 以上である高周波交流電界を印加すると、ランダムコイル状で存在する一本鎖核酸に確実に誘電分極を発生させることができる。これによって、一本鎖核酸を電界と平行に直線状に引き伸ばすことができる。

そして、上記の「誘電泳動」と呼ばれる電気力学的効果によって、分極した一本鎖核酸を自発的に電極端へと引き寄せ、前記対向電極の電極エッジにその一端を接した形で固定させることもできる。これは、DNAチップ等の反応場に検出用のDNAプローブ等を固定配置する場合に利用することができる。一端（末端）が固定された状態で伸長された一

本鎖核酸は、電界をオフにすると、元のランダムコイル状に戻る。

伸長状態にある核酸はその塩基配列が露出するため、立体障害や熱揺らぎによる悪影響もなくなり、相補鎖を備える核酸と高効率、高精度で、短時間でハイブリダイゼーションを進行させることができる。

請 求 の 範 囲

1. 次の (1) 又は (2) に記載された一本鎖核酸に対して、高周波交流電界を作用させることによって、前記一本鎖核酸を伸長させる核酸伸
5 長方法。

(1) 純水又は pH 5 ~ 11 の水溶液中に遊離して存在する一本鎖核酸。

(2) 前記水溶液に臨設された対向電極の一方又は両方の電極表面に固定されて存在する一本鎖核酸。

10 2. 前記高周波の周波数が 500 kHz 以上であって、かつ印加電圧は電界強度 $1.2 \text{ V} / \mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする請求項 1 記載の核酸伸長方法。

3. 前記対向電極間の距離を $40 \mu\text{m}$ 以下としたことを特徴とする請求項 1 記載の核酸伸長方法。

15 4. 一本鎖核酸の伸長を誘電泳動によって行うことを特徴とする請求項 1 記載の核酸伸長方法。

5. 請求項 1 記載の方法によって伸長された一本鎖核酸を一方の相補鎖とするハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする核酸伸長装置。

20 6. 水溶液を貯留できる反応場と、該反応場に高周波交流電界を形成する手段と、を少なくとも備える装置であって、前記反応場に存在する一本鎖核酸を前記高周波交流電界の作用で伸長させることを特徴とする核酸伸長装置。

25 7. 前記反応場には少なくとも一対の対向電極が設けられ、前記一本鎖核酸の末端が前記対向電極の一方又は両方の電極の表面に固定されていることを特徴とする請求項 6 記載の核酸伸長装置。

8. 前記対向電極間の距離が $40 \mu\text{m}$ 以下であることを特徴とする請求

項 7 記載の核酸伸長装置。

9. 伸長された一本鎖核酸を一方の相補鎖とするハイブリダイゼーションを請求項 6 記載の前記反応場で行うことを特徴とする核酸伸長装置。

10. 純水又は pH 5 ~ 11 の水溶液が貯留された反応場に印加された
5 高周波交流電界によって、前記水溶液中に遊離又は固定化されて存在する一本鎖核酸を前記高周波交流電界の作用で伸長させる手段を用いることを特徴とする DNA チップ。

1/6

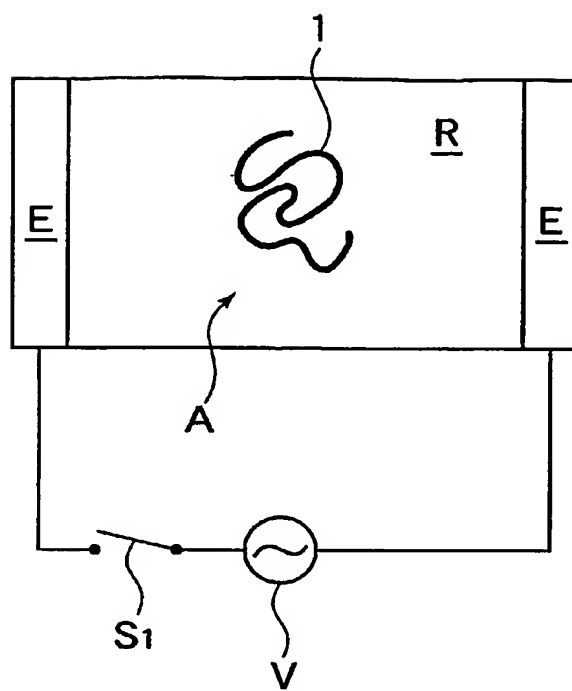


Fig.1

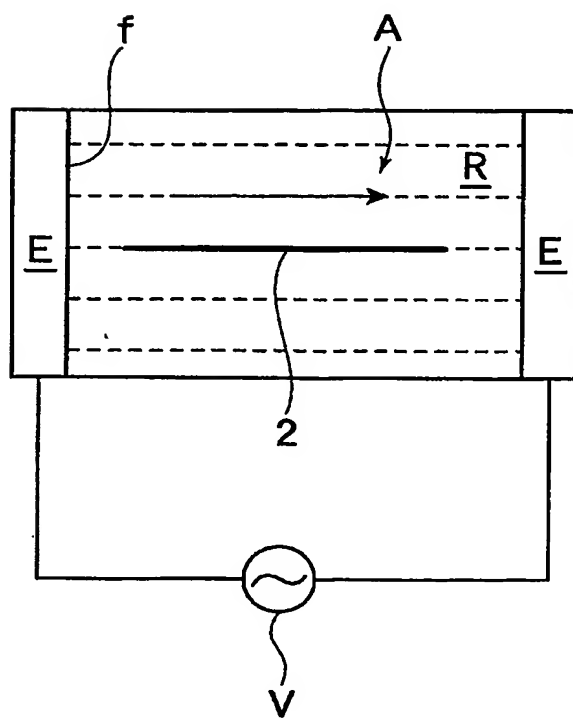


Fig.2

2/6

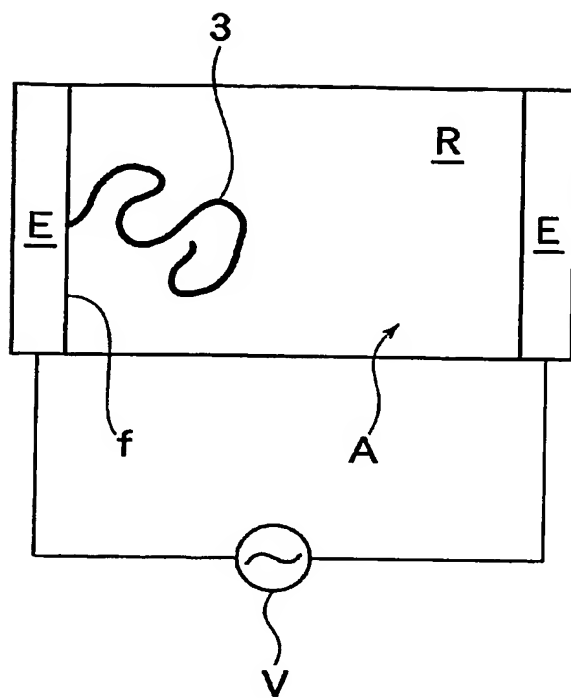


Fig.3

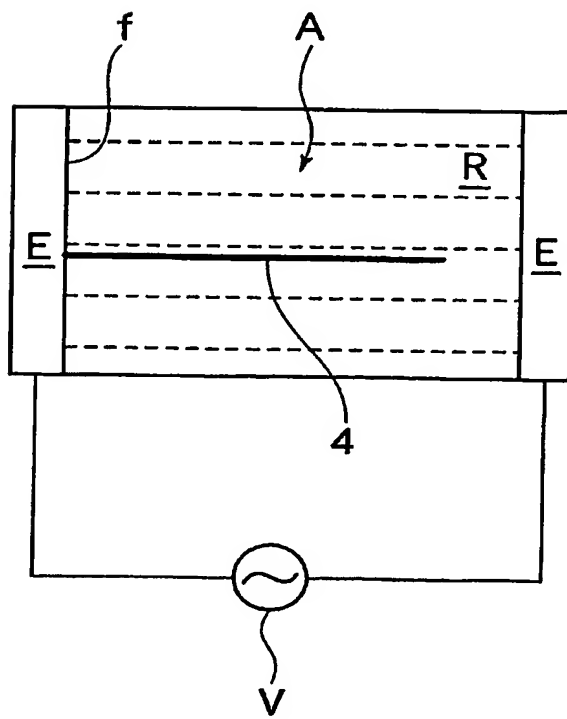


Fig.4

3/6

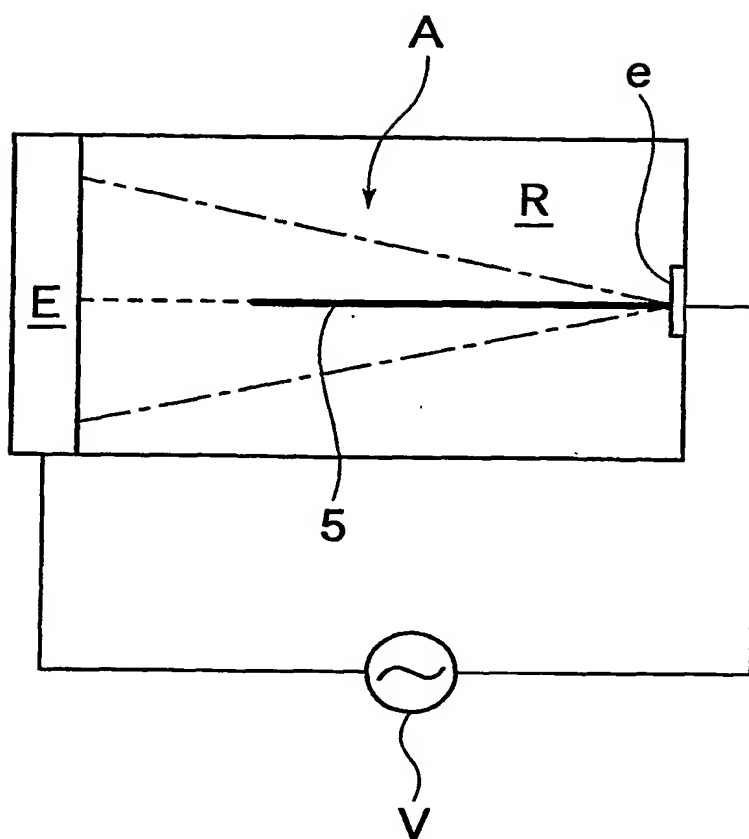


Fig.5

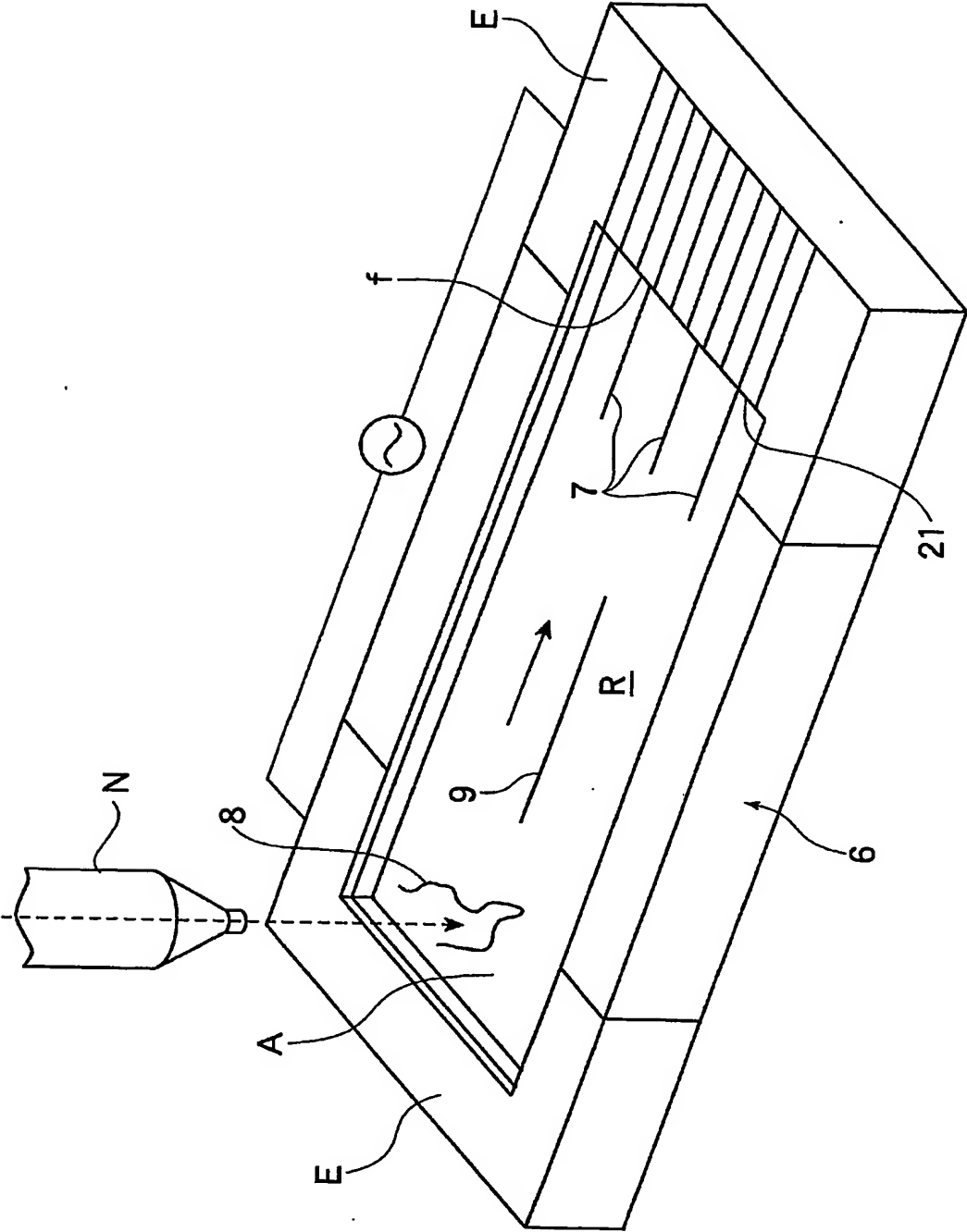


Fig.6

5/6

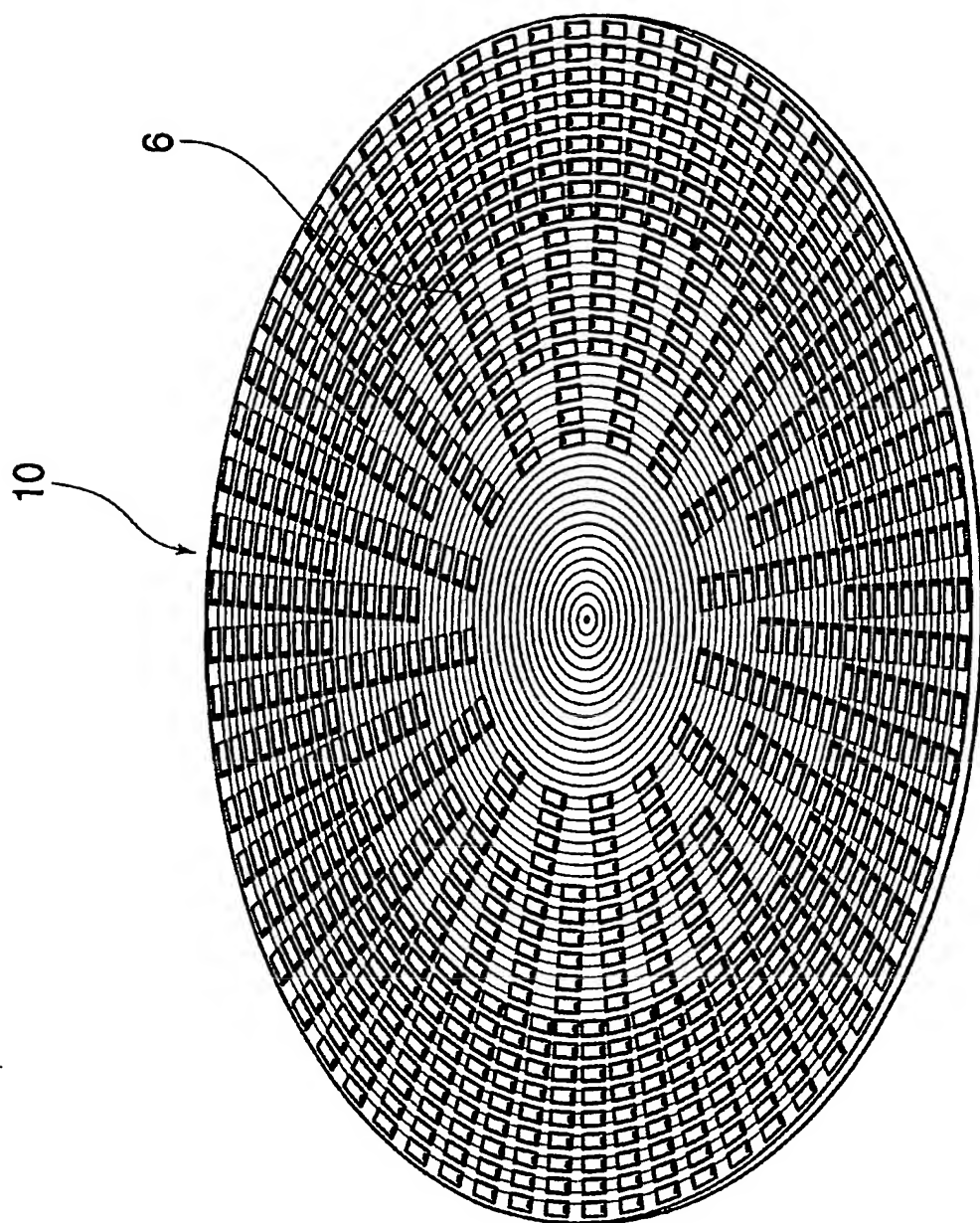


Fig.7

6/6



Fig.8



Fig.9